

**BEST AVAILABLE COPY**



**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of: **MATSUZAKI, Koichi, et al.**

Group Art Unit: **1642**

Serial No.: **10/822,860**

Examiner: **Peter J. Redding**

Filed: **April 13, 2004**

P.T.O. Confirmation No.: **2658**

For. **ANTIBODIES SPECIFIC FOR PHOSPHORYLATION SITES AND SCREENING METHODS USING THE SAME ANTIBODIES**

**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT**  
**UNDER 35 U.S.C. 119**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Date: March 9, 2007

Sir:

The claim for foreign priority of **Japanese Appln. No. 2003-351259, filed October 9, 2003**, was made on April 13, 2004.

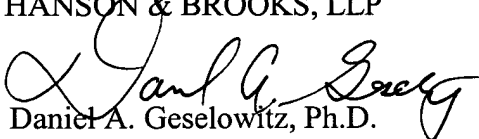
In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicant has complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,

**ARMSTRONG, KRATZ, QUINTOS,  
HANSON & BROOKS, LLP**

  
Daniel A. Geselowitz, Ph.D.

Agent for Applicant  
Reg. No. 42,573

DAG/bh  
Atty. Docket No. **040176**  
Suite 1000  
1725 K Street, N.W.  
Washington, D.C. 20006  
(202) 659-2930



**23850**

**PATENT TRADEMARK OFFICE**

BEST AVAILABLE COPY

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2003年10月 9日

出願番号  
Application Number:

特願2003-351259

パリ条約による外国への出願  
用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
the country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

JP2003-351259

願 人  
Applicant(s):

ゼリア新薬工業株式会社  
学校法人関西医科大学

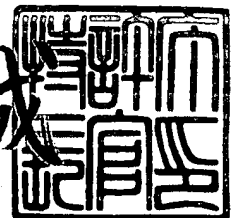
CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2007年 2月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中 嶋

誠



出証番号 出証特2007-3012909

【書類名】 特許願  
【整理番号】 DA-03546  
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願  
【提出日】 平成15年10月 9日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/15  
C07K 16/06

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府枚方市香里園山手町 1 - 2 6  
【氏名】 松崎 恒一

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府大阪市旭区太子橋 3 - 2 - 5 - 1 0 1 4  
【氏名】 關 壽仁

【発明者】  
【住所又は居所】 京都府京都市中京区富小路通御池下ル松下町 1 3 5 - 3 - 8 0 9  
【氏名】 松下 匡孝

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府吹田市山田東 1 - 1 1 - 2 宮の前グリーンハイツ 2 - 2  
0 2  
【氏名】 田橋 賢也

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府大阪市阿倍野区帝塚山 1 - 3 - 1 7  
【氏名】 古川 富紀子

【発明者】  
【住所又は居所】 京都府京都市伏見区桃山町大島 9 6 - 3 1 0  
【氏名】 菅野 康

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区本山南町 8 - 3 - 1 - 1 3 1 9  
【氏名】 森 茂生

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府堺市南陵町 4 - 4 - 1 7  
【氏名】 山縣 英生

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府守口市梅町 4 - 1 3 - 4 0 3  
【氏名】 吉田 勝紀

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府茨木市上穂積 1 - 2 - 1 4 - 5 1 0  
【氏名】 西澤 幹雄

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区木川東 1 - 3 - 4 - 3 0 3  
【氏名】 藤澤 順一

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県芦屋市東山町 7 7 2 0 3  
【氏名】 井上 恭一

【特許出願人】  
【識別番号】 000108339  
【氏名又は名称】 ゼリア新薬工業株式会社

【特許出願人】  
【識別番号】 500409219  
【氏名又は名称】 学校法人関西医科大学

【代理人】  
【識別番号】 100066692  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 浅村 皓  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100072040  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 浅村 肇  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100102897  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 池田 幸弘  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100088926  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 長沼 暉夫  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 002901  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

リン酸化された S m a d 2 のリンカー領域及びリン酸化された S m a d 3 のリンカー領域に特異的なポリクローナル抗体。

**【請求項 2】**

S m a d 2 のリンカー領域及び S m a d 3 のリンカー領域のアミノ酸配列に含まれるペプチドのリン酸化物で哺乳動物を免疫化して作製した抗血清から得られる、請求項 1 記載のポリクローナル抗体。

**【請求項 3】**

免疫化のための前記 S m a d 2 のリンカー領域のアミノ酸配列に含まれるペプチドのリン酸化物が

Pro Ala Glu p-Ser Pro Thr Thr Leu p-Ser Pro Val Asn His Ser

(配列番号 1)

(但し、p-Ser はリン酸化されたセリンを表す) であり、免疫化のための前記 S m a d 3 のリンカー領域のアミノ酸配列に含まれるペプチドのリン酸化物が

Ala Gly Ser Pro Asn Leu p-Ser Pro Asn Pro Met p-Ser Pro Ala

(配列番号 2)

(但し、p-Ser はリン酸化されたセリンを表す)

である請求項 2 記載のポリクローナル抗体。

**【請求項 4】**

前記哺乳動物がウサギである請求項 1 ～ 3 のいずれか一項記載のポリクローナル抗体。

**【請求項 5】**

更にリン酸化ペプチドでアフィニティー精製したものである請求項 1 ～ 4 のいずれか一項記載のポリクローナル抗体。

**【請求項 6】**

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項記載のポリクローナル抗体の、S m a d 2 リンカー領域及び S m a d 3 リンカー領域のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法への使用。

**【請求項 7】**

S m a d 2 リンカー領域及び S m a d 3 リンカー領域のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法であって、

( i ) T G F -  $\beta$  受容体を発現する又は発現させた哺乳類細胞を、T G F -  $\beta$  で処理する前に候補薬剤と接触させる段階、

( i i ) 該細胞を T G F -  $\beta$  とともにインキュベーションする段階、

( i i i ) インキュベーション後の該細胞を回収しホモジナイズしてホモジネートを得る段階、

( i v ) 得られたホモジネートを、Smad タンパク質に特異的な抗体とともにインキュベーションして免疫沈降複合体を形成させる段階、

( v ) 該免疫沈降複合体を請求項 1 ～ 6 のいずれか一項記載のポリクローナル抗体とともに反応させてリン酸化された S m a d タンパク質の存在の有無を検出し、リン酸化の阻害を判断する段階、

を含んでなる上記方法。

**【請求項 8】**

前記薬剤が抗線維化である請求項 7 記載の方法。

**【請求項 9】**

S m a d タンパク質のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法であって、

( i ) 基質としての S m a d タンパク質と候補薬剤とを接触させる段階、

( i i ) 該 S m a d タンパク質を活性型 p 3 8 と、A T P の存在下で反応させる段階、

( i i i ) 反応させた S m a d タンパク質中のリン酸化 S m a d タンパク質を検出し、リン酸化の阻害を判断する段階、

を含んでなる上記方法。

## 【請求項 1 0】

S m a d タンパク質のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法であって、

- ( i ) 任意の細胞を T G F -  $\beta$  で刺激し、一定時間後に細胞を回収する段階、
  - ( i i ) 該回収した細胞のホモジネートをリン酸化酵素の特異抗体で免疫沈降させる段階、
  - ( i i i ) 該免疫沈降させた試料と、候補薬剤と、S m a d 2 リコンビナントと、S m a d 3 リコンビナントとを、インビトロにてインキュベートしてS m a d 2 及びS m a d 3 をリン酸化させる段階、
  - ( i v ) 反応させたS m a d タンパク質中のリン酸化S m a d タンパク質を、リンカー領域のリン酸化に対する抗体を用いたイムノブロット法で検出し、リン酸化の阻害を判断する段階
- を含んでなる上記方法。

## 【書類名】 明細書

【発明の名称】 リン酸化部位特異的抗体及びそれを用いたスクリーニング方法

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、リン酸化部位特異的抗体及びそれを用いた薬剤のスクリーニング方法に関する。より詳細には、本発明は、トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- $\beta$ ) ファミリーのメンバーが関与するシグナルの伝達物質である S m a d 2 及び S m a d 3 のリンカー領域のリン酸化部位を特異的に認識する新規抗体に関する。更に本発明は、S m a d 2 及び S m a d 3 のリンカー領域のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

TGF- $\beta$  スーパーファミリーは、TGF- $\beta$ 、BMP等を包含し、生体内において細胞の分化、増殖抑制、組織修復等、様々な生理活性、細胞調節機能を有する多機能タンパク質のファミリーを形成する。TGF- $\beta$ はその代表的なサイトカインであり、シグナル伝達カスケードにより標的遺伝子群の転写活性を促進又は抑制することが知られている。

## 【0 0 0 3】

TGF- $\beta$ は、血小板などの種々の組織で産生され、いろいろな細胞に作用することが知られている。TGF- $\beta$ は、肝細胞などの上皮細胞には細胞増殖を抑制するが、線維芽細胞などの間葉細胞には細胞外マトリクス (ECM) の蓄積を促進することにより、組織の修復に働く。

## 【0 0 0 4】

活性化した S m a d は、I 型コラーゲンやプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター・I 型 (PAI-1) のような ECM 蛋白のプロモーター領域に直接結合し、AP-1 や ATF-2 など他の転写因子と複合体を形成し、それぞれの転写を活性化している。

## 【0 0 0 5】

TGF- $\beta$  受容体には 2 種類あり、分子量の違いから I 型、II 型 と呼ばれ、これらが殆どの細胞で発現している。受容体はいずれも細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ領域を有している。

## 【0 0 0 6】

TGF- $\beta$  は初めに II 型受容体に結合し、次いで I 型受容体に結合して、複合体を形成する。この時 II 型受容体は I 型受容体をリン酸化し、これにより活性化された I 型受容体が、更に S m a d と呼ばれるより下流の一連の TGF- $\beta$  シグナル伝達因子をリン酸化することによって、細胞内にシグナルが伝達される (非特許文献 1)。受容体によって活性化された S m a d は、核内に移行した後、標的遺伝子の転写因子として作用する。

## 【0 0 0 7】

S m a d タンパク質ファミリーのメンバーは、ショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) の BMP ホモログである D p p (d e c a p e n t a p l e g i c) のシグナルを修飾する遺伝子のスクリーニングの結果、D p p に対するマザー (M a d : M o t h e r s a g a i n s t D p p) との相同性に基づいて同定された。一方、線虫 (C. e l e g a n s) の BMP 様因子の受容体である D A F - 4 の遺伝子 d a f - 4 の異常と同様の表現型を示す遺伝子として s m a - 2、- 3、- 4 が得られた。これらの遺伝子がコードする S m a タンパク質と M a d はいずれも TGF- $\beta$  スーパーファミリーのシグナルを伝達し、互いに高いアミノ酸相同性を有することから、これらを S m a d と呼んでいる。一般に S m a d は 5 0 0 前後のアミノ酸からなるタンパク質で、哺乳動物ではこれまでに 8 種類のタンパク質 S m a d 1 ~ 8 が同定されている。

## 【0 0 0 8】

S m a d はその構造と機能から 3 つのタイプに分類することができる。すなわち、受容体によって活性化されて TGF- $\beta$  と BMP のそれぞれの経路で特異的なシグナルを伝える R - S m a d (r e c e p t o r - r e g u l a t e d S m a d)、すべての経路で

共通に用いられ R-Smad と複合体を形成する Co-Smad (common-mediator Smad)、更にこれらのシグナルを伝達する Smad に抑制的に作用する I-Smad (inhibitory Smad) である。R-Smad としては Smad1~3、5 及び 8 が、Co-Smad としては Smad4 が、I-Smad としては Smad6 及び 7 が知られている。

#### 【0009】

一般に、Smad の N 末端側と C 末端側には、Smad ファミリー間で高く保存された MH1 (Mad homology 1) ドメイン及び MH2 ドメインと呼ばれる領域がそれぞれ存在する。MH1 ドメインと MH2 ドメインとはリンカー領域と呼ばれるホモロジーの低い領域で繋がっている。

#### 【0010】

Smad1、Smad2 及び Smad3 のリンカー領域は Erk によって Ser 残基がリン酸化を受けることが知られている (非特許文献 2 及び 3)。同様に、Smad2 のリンカー領域の Ser240 及び Ser260 は MH1 ドメインの Ser110 と同様に CamKII によってリン酸化される。

#### 【0011】

R-Smad の最も C 末端側には Ser-Ser-X-Ser というアミノ酸配列 (SXS モチーフ) があり、特に C 末端に近い 2 つの Ser が I 型受容体によってリン酸化を受ける。

#### 【0012】

Smad は TGF- $\beta$  ファミリーメンバーの経路に特異的な役割を果たし、Smad2 及び Smad3 は TGF- $\beta$  シグナリングに対して特異的である (非特許文献 1)。活性化した Smad2 及び Smad3 は Co-Smad である Smad4 と相互作用して、核に移行し、標的遺伝子を活性化する。TGF- $\beta$  経路は、Smad2 及び Smad3 の活性化と共に、I-Smad である Smad6 と Smad7 によりシグナリングのバランスをとっている。

#### 【0013】

【非特許文献 1】Heldin ら、Nature 390:465-471, 1997

【非特許文献 2】Kretzschmar ら、Nature 389:618-622, 1997

【非特許文献 3】Kretzschmar ら、Genes Dev. 13:804-816, 1999

【非特許文献 4】Journal of Biological Chemistry 278(13):11721-11728(2003)

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0014】

上述のように、Smad は TGF- $\beta$  依存的な ECM 蛋白の蓄積に関わる重要なタンパク質であることから、このタンパク質を効率よく阻害することは、肝臓をはじめ、腎臓、肺等の線維化に対し、抗線維化の効果が期待できると考えられる。

#### 【0015】

Smad はその一次構造上、DNA 結合領域、リンカー領域、調節領域の 3 つの領域に分けられる。従来 C 末端領域のリン酸化に特異的な抗体を用いた解析 (非特許文献 4) や、C 末端領域を欠くミュータントを  $^{32}\text{P}$  によって標識 (label) し解析した結果、TGF- $\beta$  による Smad の活性化は C 末端領域のリン酸化が重要であると考えられてきた (非特許文献 4)。しかしながら、これまでリンカー領域のリン酸化を選択的に解析することはできず、従ってその重要性については全く不明であった。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0016】

そこで本発明者らは、Smad2 及び Smad3 のリンカー領域のリン酸化を特異的に



検出することができる抗体を作製することを鋭意検討し、これを用いてリンカー領域のリン酸化の解析を実施したところ、C末端領域のリン酸化だけでなくリンカー領域のリン酸化も S m a d の活性化に極めて重要であることを見出した。特に、リンカー領域がリン酸化された S m a d 3 が核に存在することが確認され、そのため転写が持続的に行われると考えられる。これが病態時に ECM 蛋白の産生が促進される要因の一つであると考えられる。

#### 【0017】

そこで、このリンカー領域のリン酸化を阻害することにより、生理的な条件下ではあまり影響を与えないが、ECM蛋白産生などが持続的に行われている病態時にのみ特異的にECM蛋白の転写を抑制することができると考えられる。

#### 【0018】

即ち、本発明は、リン酸化された S m a d 2 のリンカー領域及び S m a d 3 のリンカー領域に特異的なポリクローナル抗体に関する。

また、本発明は、S m a d 2 のリンカー領域及び S m a d 3 のリンカー領域のアミノ酸配列に含まれるペプチドのリン酸化物で哺乳動物を免疫化して作製した抗血清から得られる、リン酸化された S m a d 2 及び S m a d 3 に特異的に結合するポリクローナル抗体に関する。

#### 【0019】

また、本発明は、S m a d 2 リンカー領域及び S m a d 3 リンカー領域のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法であって、

(i) T G F -  $\beta$  受容体を発現する又は発現させた哺乳類細胞を、T G F -  $\beta$  で処理する前に候補薬剤と接触させる段階、

(i i) 該細胞を T G F -  $\beta$  とともにインキュベーションする段階、

(i i i) インキュベーション後の該細胞を回収しホモジナイズしてホモジネートを得る段階、

(i v) 得られたホモジネートを、S m a d タンパク質に特異的な抗体とともにインキュベーションして免疫沈降複合体を形成させる段階、

(v) 該免疫沈降複合体を本発明のポリクローナル抗体とともに反応させてリン酸化された S m a d タンパク質の存在の有無を検出し、リン酸化の阻害を判断する段階、  
を含んでなる上記方法、にも関する。

#### 【0020】

また更に、本発明は、S m a d タンパク質のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法であって、

(i) 基質としての S m a d タンパク質と候補薬剤とを接触させる段階、

(i i) 該 S m a d タンパク質を活性型 p 3 8 と、A T P の存在下で反応させる段階、

(i i i) 反応させた S m a d タンパク質中のリン酸化 S m a d タンパク質を検出し、リン酸化の阻害を判断する段階、  
を含んでなる上記方法、にも関する。

#### 【0021】

更に本発明は、S m a d タンパク質のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法であって、

(i) 任意の細胞を T G F -  $\beta$  で刺激し、一定時間後に細胞を回収する段階、

(i i) 該回収した細胞のホモジネートをリン酸化酵素の特異抗体で免疫沈降させる段階、

(i i i) 該免疫沈降させた試料と、候補薬剤と、S m a d 2 リコンビナントと、S m a d 3 リコンビナントとを、インビトロにてインキュベートして S m a d 2 及び S m a d 3 をリン酸化させる段階、

(i v) 反応させた S m a d タンパク質中のリン酸化 S m a d タンパク質を、リンカー領域のリン酸化に対する抗体を用いたイムノブロット法で検出し、リン酸化の阻害を判断する段階、

を含んでなる上記方法、にも関する。

【発明の効果】

【0022】

本発明の抗体、スクリーニング方法等によれば、従来のようにリンカー領域のリン酸化とC末端領域のリン酸化とを区別せずにC末端領域でのリン酸化のみを検出していたリン酸化検出方法に比べ、より効率良く、より特異的にSma d リン酸化阻害剤、ひいては抗線維化薬をスクリーニングすることができる。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、リン酸化されたSma d 2のリンカー領域及びリン酸化されたSma d 3のリンカー領域、又は該リンカー領域並びにSma d 2及び3のC末端領域の両方に特異的なポリクローナル抗体に関する。

【0024】

本発明のポリクローナル抗体は、Sma d 2のリンカー領域及びSma d 3のリンカー領域のアミノ酸配列に含まれるペプチドのリン酸化物で哺乳動物を免疫化して作製した抗血清から得ることができる。

【0025】

免疫化すべき哺乳動物はウサギ、ヤギ、マウス等であることが好ましい。

本発明のポリクローナル抗体は、Sma d 2及びSma d 3のリンカー領域のリン酸化に特異的である。

【0026】

Sma d 2及び3の、リンカー領域及びC末端領域を含むアミノ酸配列はそれぞれ、Genbank:NM\_005901(human Sma d 2)及びGenbank:NM\_005902(human Sma d 3)に示されている。リン酸化されるペプチドの位置は図1に模式的に示されている。図1は、Sma d 蛋白質の一次構造による各機能ドメインを示し、N末端側にMH1ドメイン、C末端側にMH2ドメインを有し、これら二つのドメインを繋げている領域がリンカー領域と呼ばれている。リン酸化酵素によりリン酸化されると考えられる又はリン酸化される部位は、リンカー領域に4箇所、C末端領域に2箇所ある。

【0027】

具体的には、以下の通りである。

Sma d 2のリンカー領域のリン酸化ペプチドは、アミノ酸残基245番目から259番目までに対応し、

Pro Ala Glu Leu p-Ser Pro Thr Thr Leu p-Ser Pro Val Asn His Ser (配列番号1)で表される。但し、p-Serはリン酸化されたセリンを表し、そのリン酸化部位は249番目のSer、254番目のSerに該当する。

【0028】

Sma d 3のリンカー領域のリン酸化ペプチドは、アミノ酸残基201番目から214番目までに対応し、

Ala Gly Ser Pro Asn Leu p-Ser Pro Asn Pro Met p-Ser Pro Ala (配列番号2)で表される。但し、p-Serはリン酸化されたセリンを表し、そのリン酸化部位は207番目のSer、212番目のSerに該当する。

【0029】

Sma d 2のC末端リン酸化ペプチドは、アミノ酸残基459番目から467番目までに対応し、

Pro Ser Val Arg Cys Ser p-Ser Met p-Ser (配列番号3)で表される。但し、p-Serはリン酸化されたセリンを表し、そのリン酸化部位は465番目のSer、467番目のSerに該当する。

【0030】

Sma d 3のC末端リン酸化ペプチドは、アミノ酸残基417番目から425番目まで

に対応し、

Pro Ser Ile Arg Cys Ser p-Ser Val p-Ser (配列番号 4)

で表される。但し、p-Serはリン酸化されたセリンを表し、そのリン酸化部位は423番目のSer、425番目のSerに該当する。

#### 【0031】

本発明のポリクローナル抗体は、更にリン酸化ペプチドのアフィニティー精製に付して得られたものであることが好ましい。例えば、Sma d 2及び3のリン酸化されたリンカー領域及びC末端ペプチドのアフィニティーカラム (Activated Thiol Sepharose 4B、Amersham Biosciences等) をそれぞれ作製し、それぞれの抗体をアフィニティー精製すればよい。

#### 【0032】

以下にSma dタンパク質のリンカー領域のリン酸化物に特異的な抗体の作製方法について述べる。

Sma d 2及びSma d 3のリンカー領域、並びにSma d 2及びSma d 3のC末端のそれぞれに特異的な上記の4種のリン酸化ペプチドでウサギ等の哺乳動物を免疫化して、抗血清を得る。得られた抗血清から、リン酸化されたSma dに特異的な抗血清を選択し、更にリン酸化ペプチドでアフィニティー精製することにより、ポリクローナル抗体を得る。

#### 【0033】

本発明のリン酸化されたSma d 2のリンカー領域及びリン酸化されたSma d 3のリンカー領域に特異的なポリクローナル抗体は、Sma d 2リンカー領域及びSma d 3リンカー領域のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法に使用することができる。

#### 【0034】

そこで、本発明のSma d 2リンカー領域及びSma d 3リンカー領域のリン酸化を阻害するかどうかを調べたい薬剤 (本願では、候補薬剤とも言う) のスクリーニング方法は、少なくとも以下の段階からなる。

(i) TGF- $\beta$ 受容体を発現する又は発現させた哺乳類細胞を、TGF- $\beta$ で処理する前に候補薬剤と接触させる段階、

(ii) 該細胞をTGF- $\beta$ とともにインキュベーションする段階、

(iii) インキュベーション後の該細胞を回収しホモジナイズしてホモジネートを得る段階、

(iv) 得られたホモジネートを、Sma dタンパク質に特異的な抗体とともにインキュベーションして免疫沈降複合体を形成させる段階、

(v) 該免疫沈降複合体を本発明のポリクローナル抗体とともに反応させてリン酸化されたSma dタンパク質の存在の有無を検出し、リン酸化の阻害を判断する段階。

#### 【0035】

上記(i)～(v)の段階では、TGF- $\beta$ 受容体を発現する若しくは発現させた哺乳類の培養細胞、又はSma d 2若しくは3に必要な応じてGST、FLAGなどのタグを付した融合タンパク質を発現させた細胞を用いる。その細胞をTGF- $\beta$ で刺激し、任意の時間後細胞を回収し、ホモジナイズする。そのホモジネートを公知のSma d特異抗体で免疫沈降させる。公知のSma d特異抗体としては、例えば、Santa Cruz Biotechnology社、Upstate Biotechnology社、又はSignal Transduction Lab. 社からの抗Sma d 2/3抗体が挙げられる。次いで、リンカー領域がリン酸化されたSma d 2及びSma d 3を特異的に認識する抗体 (以下、それぞれSma d 2及びSma d 3のリン酸化特異的な抗体とも言う) で領域特異的なリン酸化動態を確認する。この一連の段階において、候補薬剤で細胞を処理した後に、該細胞をTGF- $\beta$ とともにインキュベーションし、次いでSma dタンパク質に特異的な抗体とともにインキュベーションして免疫沈降複合体を形成させてから、この複合体を本発明のリン酸化されたSma d 2のリンカー領域及びリン酸化されたSma d 3のリンカー領域に特異的なポリクローナル抗体と反応させ、リン酸化されたSm

a d タンパク質の存在の有無を検出すれば、該候補薬剤が S m a d 2 及び S m a d 3 のリン酸化を阻害するか否かを判断することができる。すなわち、ポリクローナル抗体がリン酸化 S m a d タンパク質を検出すれば、該細胞中の S m a d 2 及び 3 のリンカー領域が T G F -  $\beta$  シグナル機構によりリン酸化されていたことになり、候補薬剤は S m a d のリン酸化を阻害する薬剤ではないことになる。一方、ポリクローナル抗体がリン酸化 S m a d タンパク質を検出しなければ、リンカー領域はリン酸化されていないことになり、候補薬剤は S m a d のリン酸化を阻害する化合物であるということになる。これにより T G F -  $\beta$  による S m a d のリン酸化を特異的に阻害する化合物を目的に添ってスクリーニングすることができる。

#### 【0036】

上記スクリーニング方法は、S m a d 2 リンカー領域及び S m a d 3 リンカー領域のリン酸化を阻害する薬剤の製造方法において、一つの工程（段階）として組み込むことができ、当業者であれば本明細書の開示から容易に上記スクリーニング方法が当該薬剤製造方法の一部をなすことが理解できるはずである。

#### 【0037】

これにより得られた薬剤は、S m a d タンパク質のリンカー領域のリン酸化を阻害し、例えば非生理的な T G F -  $\beta$  の作用の一つであるコラーゲンの持続的生産等に対する抗線維化薬として有用である。

#### 【0038】

本発明のスクリーニング方法のもう一つの態様である、p 3 8 を用いる、S m a d タンパク質のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法は、少なくとも以下の段階からなる。

- (i) 基質としての S m a d タンパク質と候補薬剤とを接触させる段階、
- (i i) 該 S m a d タンパク質を活性型 p 3 8 と、A T P の存在下で反応させる段階、
- (i i i) 反応させた S m a d タンパク質中のリン酸化 S m a d タンパク質を検出し、リン酸化の阻害を判断する段階。

#### 【0039】

このスクリーニング方法はいわゆるインビトロキナーゼアッセイを用いている。インビトロキナーゼアッセイとは、試験管（チューブ）内で、リン酸化酵素と基質（本発明の場合、S m a d タンパク質）を A T P の存在下で反応させて基質をリン酸化させるものである。即ち、細胞内での反応ではなく、また他の干渉物質のない条件下で、S m a d タンパク質が直接リン酸化されるか否かを見極められる方法である。

#### 【0040】

また、本発明のスクリーニング方法のもう一つの態様である、S m a d リコンビナントを用いる、S m a d タンパク質のリン酸化を阻害する薬剤のスクリーニング方法は、少なくとも以下の段階からなる。

- (i) 任意の細胞を T G F -  $\beta$  で刺激し、一定時間後に細胞を回収する段階、
- (i i) 該回収した細胞のホモジネートをリン酸化酵素の特異抗体で免疫沈降させる段階、
- (i i i) 該免疫沈降させた試料と、候補物質と、S m a d 2 リコンビナントと、S m a d 3 リコンビナントとを、インビトロにてインキュベートして S m a d 2 及び S m a d 3 をリン酸化させる段階、
- (i v) 反応させた S m a d タンパク質中のリン酸化 S m a d タンパク質を、リンカー領域のリン酸化に対する抗体を用いたイムノブロット法で検出し、リン酸化の阻害を判断する段階。

#### 【0041】

具体的には、培養細胞を無血清条件下で培養した後、T G F -  $\beta$  を処置し、所定時間後に細胞を回収し、リン酸化酵素の活性型であるリン酸化 J N K 又はリン酸化 p 3 8（これらの酵素は、酵素自身がリン酸化されることにより活性型となる）をそれらの特異抗体（P r o m e g a 社から入手可能）で免疫沈降させ、プロテイン G - セファロースを用いて単離し、キ

キナーゼバッファーで洗浄し懸濁させたものを酵素標品とする。この酵素標品と、大腸菌で作製したリコンビナントGST-Smad3及びGST-Smad2 2 $\mu$ gを100 $\mu$ M ATPを含む50 $\mu$ l キナーゼバッファーにて反応させる。それをSDSポリアクリルアミド電気泳動により分離し、消費されたATPを化学発光により定量するか、又は作製した各リン酸化抗体を用いたイムノブロット法等によりリン酸化Smadを検出する。

#### 【0042】

ここで、上記リン酸化酵素の特異抗体とは、p38又はJNK (c-Jun N末端キナーゼ) の活性化型酵素に対する特異的抗体のことを言う。p38やJNKはいずれもリン酸化されることにより活性化され、それぞれの活性化型酵素に対する抗体としては、以下のものが挙げられる。

#### 【0043】

抗 活性化型p38抗体 (Anti-Active p38/pTGpY、rabbit、メーカー:Promega社)

p38自身のリン酸化部位であるアミノ酸182番目のThr、183番目のGly、184番目のTyrの内、182番目のThr、184番目のTyrがリン酸化されているp38に対する特異的な抗体。

抗 活性化型JNK抗体 (Anti-Active JNK/pTPpY、rabbit) /メーカー:Promega社)

JNK自身のリン酸化部位であるアミノ酸183番目のThr、184番目のPro、185番目のTyrの内、183番目のThr、185番目のTyrがリン酸化されているJNKに対する特異的な抗体。

#### 【0044】

Smad2リコンビナント及びSmad3リコンビナントとは、Smad3及びSmad2のN末端にGSTを融合させたリコンビナント蛋白質のことであり、大腸菌(DH5 $\alpha$ )を用いて作製したものである。IPTG (イソプロピルーチオ $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) で発現誘導されるよう構成させたGST-Smad2及びGST-Smad3を含むプラスミドを大腸菌に組み込み、その大腸菌を一晩培養し、IPTGで発現させた後、超音波破碎により大腸菌を破壊する。得られた抽出液の遠心上清をグルタチオンセファロース4Bカラムに添加し、PBS (-)及び50mM Tris-HClバッファー、pH 8.0で洗浄後、10mM還元型グルタチオンを含む50mM Tris-HClバッファー、pH 8.0でGST-Smadタンパク質を溶出する。このようにして得られたGST-Smad3及びGST-Smad2を各試験に用いる。

本発明の抗体を用いてSmad3のリンカー領域がp38及びJNKによりリン酸化されることが確認された。本反応系に候補化合物で処置することにより、リン酸化を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。

#### 【0045】

##### (1) Smadを介する肝線維化シグナル伝達機構

TGF- $\beta$ シグナル伝達物質であるSmad2及びSmad3の、MAPキナーゼ(MAPK)によりリン酸化されるそれぞれのリンカー部位と、I型TGF- $\beta$ 受容体によってリン酸化されるそれぞれのC末端部位とに対して特異的な、抗Smad2及び3のリン酸化物に対する抗体を、本発明者らは計4種類作製した。更に、培養筋線維芽細胞を用いた検討から、活性化したp38MAPKが、Smad3のリンカー部位をリン酸化させることで、細胞外マトリクス(ECM)の産生を促していることを見出した。本発明者らは、これら抗体を用い、障害肝組織中の活性化星細胞(HSC)及び筋線維芽細胞(MFB)におけるSmad2及び3のリン酸化状態を比較検討し、Smadを介したシグナル伝達を明らかにした。

それぞれの部位に特異的なリン酸化ペプチドで各々ウサギ3~5羽を免疫し、抗血清を得た。これらからリン酸化されたSmadに特異的な抗血清だけを選択し、抗原特異性を高めるために、免疫したペプチドでアフィニティ精製した。

#### 【0046】

急性肝障害ラットでは、CCl<sub>4</sub>投与後36時間で中心静脈域を中心に肝細胞の脱落と強い炎症細胞浸潤が認められ、72時間でこれらは改善した。

免疫組織学的検討では、肝障害の中心静脈域に  $\alpha$  Smooth Muscle Actin 及び Vimentin 陽性となった活性化 HSC 細胞を認めた。正常肝には認められなかったが、障害肝の活性化 HSC 細胞において、リンカー部がリン酸化された Smad3 と C 末端がリン酸化された Smad2 及び 3 は、核内に認められた。また、リンカー部がリン酸化された Smad2 は細胞質に認められた。

【0047】

ラット肝から星細胞を分離し、抗 Smad2 及び 3 抗体で免疫沈降後、ウェスタン法でリン酸化状態を解析した。正常星細胞で Smad2 及び 3 は殆どリン酸化されていなかった。投与後 36 時間をピークに Smad2 及び 3 のリンカー部と C 末端のリン酸化は全て亢進し、72 時間後に減少した。

【0048】

慢性肝障害ラットの組織学的検討では、CCl<sub>4</sub> 連続投与後 3～6 週間で線維化の進展に伴い小葉構造の改築が認められた。

免疫組織学的検討では、障害肝において線維束に沿って  $\alpha$  SMA 及び Vimentin 陽性の MFB 様細胞を認めた。この細胞では、リンカー部がリン酸化された Smad3 と C 末端がリン酸化された Smad2 はそれぞれ核内に認められ、リンカー部がリン酸化された Smad2 は細胞質に認められた。しかし、C 末端がリン酸化された Smad3 は認められなかった。

【0049】

MFB 様細胞を分離し、ウェスタン法でリン酸化状態を解析した。連続投与後 3～6 週間で Smad2 及び 3 のそれぞれのリンカー部と C 末端のリン酸化が強く認められた。しかし、血中 TGF- $\beta$  濃度の上昇にもかかわらず Smad3 の C 末端のリン酸化は認められなかった。

急性肝障害後の HSC 細胞とは異なり、慢性肝障害過程の MFB 細胞においては、p38 MAPK の活性化に伴って Smad3 のリンカー部位が恒常的にリン酸化され核に移行しているため、I 型 TGF- $\beta$  受容体から C 末端リン酸化ができなくなっていると考えられる。

【0050】

(2) 初代培養星細胞におけるリン酸化された Smad2 及び Smad3 に特異的な抗体を用いた TGF- $\beta$  シグナル伝達機構の解析

本発明者らは、肝疾患における TGF- $\beta$  シグナル伝達の意義について報告した (Hepatology 2002, 35:49-61)。

【0051】

本発明者らは更に、TGF- $\beta$  による Smad2 及び 3 のリン酸化に焦点を絞り、このリン酸化された Smad2 及び Smad3 に特異的な抗体を用いて初代培養星細胞における Smad2 と Smad3 を介するシグナル伝達の相違を明らかにした。

【0052】

それぞれの部位に特異的なリン酸化ペプチドで各々ウサギ 3～5 羽を免疫し、抗血清を得た。これらからリン酸化された Smad に特異的な抗血清だけを選択し、抗原特異性を高めるために、免疫したペプチドでアフィニティ精製した。

【0053】

常法により初代培養星細胞を分離培養し、TGF- $\beta$  を添加したところ、5 分後からは同時に Smad2 及び 3 の C 末端のみならず Smad3 のリンカー部位が著明にリン酸化された。しかし、Smad2 リンカー部位の TGF- $\beta$  依存性リン酸化は軽度であった。

【0054】

Smad3 リンカー部位のリン酸化は、TGF- $\beta$  を添加すると、p38 MAPK の活性化を伴って増強し、その阻害剤で減弱した。

Smad2 のリンカーがリン酸化されると、Smad4 との 2 量体形成が促進した。しかし、Smad2 の核移行には C 末端のリン酸化が必要であった。

## 【0055】

TGF- $\beta$ 添加後、Sma d 3は、リンカー部がリン酸化されない場合においてもI型受容体によりC末端がリン酸化され、Sma d 4と2量体を形成し、核に移行していた。Sma d 3・Sma d 4複合体は、標的遺伝子Sma d 7の転写調節領域上のSma d結合部位に存在しており、TGF- $\beta$ 依存性にその転写活性を促進した。

## 【0056】

逆に、C末端がリン酸化されない場合においても、p38MAPKによる刺激だけでリンカー部がリン酸化され、Sma d 4と2量体を形成し、核に移行していた。このSma d 3・Sma d 4複合体も、Sma d 7のSma d結合部位に存在していたが、驚いたことにSma d 7の転写活性は促進されなかった。

## 【0057】

p38MAPK依存性にリン酸化されたSma d 3は、I型TGF- $\beta$ 受容体依存性にリン酸化されたSma d 3とは異なる独立したシグナルを伝達すると考えられた。初代培養星細胞におけるSma d 7転写の活性化には、Sma d 3のC末端がリン酸化されることが必要であると考察された。

## 【0058】

(3) 培養筋線維芽細胞におけるリン酸化されたSma d 2及びSma d 3に特異的な抗体を用いたTGF- $\beta$ シグナル伝達機構の解析

星細胞の活性化に伴い形質転換した筋線維芽細胞は、肝線維化に重要な役割を果たすことが知られている。またTGF- $\beta$ は肝線維化を進展させる重要なサイトカインである。しかし培養筋線維芽細胞におけるTGF- $\beta$ シグナル伝達物質であるSma d 2及び3の部位特異的リン酸化を指標としたTGF- $\beta$ シグナル伝達の解析は、これまで報告されていない。

## 【0059】

本発明者らは、Sma d 2及び3のリン酸化に焦点を絞り、このリン酸化抗体を用いて培養筋線維芽細胞におけるSma dを介するシグナル伝達を明らかにした。

## 【0060】

Sma d 2及び3のそれぞれのリンカー部位とC末端部位に特異的なリン酸化ペプチドで各々ウサギ3～5羽を免疫し、抗血清を得た。

常法により初代培養星細胞を分離培養し、14日目の活性化星細胞（筋線維芽細胞様細胞）を実験に用いた。Sma d 2及び3のリン酸化は、抗Sma d 2及び3抗体で免疫沈降後、部位特異的にリン酸化されたSma d 2及びSma d 3に対する抗体を用いたウェスタン法によって検討した。本細胞においてSma d 2及び3のリンカー部位とSma d 2のC末端は、すでにリン酸化された状態であった。TGF- $\beta$ を添加したところ、Sma d 2のC末端のみならずSma d 3のリンカー部位が著名にリン酸化された。しかし、Sma d 3のC末端はリン酸化されなかった。

## 【0061】

Sma d 3のリンカー部位のリン酸化に比例して、p38MAPKもリン酸化されており、TGF- $\beta$ を添加すると著明にリン酸化された。Sma d 3のリンカー部位のリン酸化は、p38MAPK阻害剤によって減弱したことから、TGF- $\beta$ によって活性化されたp38MAPKがリン酸化に関わっていると推測された。

## 【0062】

p38MAPKによる刺激でリン酸化されたSma d 3は、Sma d 4と2量体を形成し、核に移行していた。このSma d 3・Sma d 4複合体は、ECMタンパク質の一つであるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター（PAI-1）のSma d結合部位に存在しており、その転写活性を促進した。

## 【0063】

初代培養星細胞と異なり、筋線維芽細胞ではp38MAPKが活性化され、Sma d 3のリンカー部位が恒常的にリン酸化され核に移行するため、I型TGF- $\beta$ 受容体からC末端のリン酸化ができなくなっていると推測される。リンカー部位のリン酸化に伴うSm

a d 3 の活性化は、同細胞における E C M タンパク質の持続的蓄積性に強く関わっているものと考察された。

#### 【実施例】

##### 【0064】

例1 リンカー領域がリン酸化された S m a d に特異的な抗体の作製と特異性の確認

##### (1) 結果の概要

S m a d 2 及び S m a d 3 のそれぞれのリンカー領域、並びにそれぞれの C 末端に特異的なリン酸化ペプチド

Pro Ala Glu Leu p-Ser Pro Thr Thr Leu p-Ser Pro Val Asn His Ser (配列番号1)

Ala Gly Ser Pro Asn Leu p-Ser Pro Asn Pro Met p-Ser Pro Ala (配列番号2)、

Pro Ser Val Arg Cys Ser p-Ser Met p-Ser (配列番号3)、

Pro Ser Ile Arg Cys Ser p-Ser Val p-Ser (配列番号4)

(但し、p-Serはリン酸化されたセリンを表す)

を作製し、それぞれのペプチドとキャリアタンパク質として用いるウシサイクログロブリンとを結合させ、その融合タンパク質とアジュバンドとの混合物を作製した。このアジュバンド複合体で3～5匹のウサギを免疫し、その後2週間おきに同様の方法で追加免疫を4～7回実施した。最終的にそれぞれのウサギから採血し、抗血清を得た。次いで、リン酸化された S m a d 2 及び3のリンカー領域及びC末端ペプチドのアフィニティーカラム (Activated Thiol Sepharose 4B, Amersham Biosciences) をそれぞれ作製し、それぞれの抗体をアフィニティー精製した。即ち、作製したリン酸化ペプチドのアフィニティーカラムにそれぞれ得られた抗血清を添加し、0.2M グリシン-HCl バッファー (pH2.5) で溶出後、目的の抗体を含む分画を採取し、精製抗体とした。用いたペプチドの S m a d タンパク質の1次構造上における位置を図1に示す。

##### 【0065】

##### (2) 方法

リンカー領域がリン酸化された S m a d 2 及び S m a d 3 の検出並びに抗体の特異性を確認した。

T G F -  $\beta$  受容体を発現する培養細胞又は発現させた培養細胞、又は S m a d 2 又は S m a d 3 に G S T 等のタグが付いた融合タンパク質を発現させた細胞を、T G F -  $\beta$  で刺激し、任意の時間後細胞を回収し、ホモジネートする。そのホモジネートを S m a d 特異抗体で免疫沈降させた後、それぞれリン酸化された S m a d 2 及び S m a d 3 に特異的な抗体で領域特異的なリン酸化動態を確認する。より具体的には以下の操作を行った。

##### 【0066】

F L A G タグ S m a d 3 及び S m a d 2 c D N A (W T)、それらのリンカー領域のリン酸化部位を変異させた c D N A (E P S M)、及び C 末端領域のリン酸化部位を変異させた c D N A (3 S - A) を作製し、C M V プロモーター下で構造的に発現させるような発現ベクターを構築した。細胞は既述の C C 1 4 処置ラットから単離精製した肝星細胞 (H S C) を培養し、筋線維芽細胞様に分化させた細胞、及びラット正常肝臓から樹立された肝細胞クローン9 (I. B., Weinstein, et. al. Cancer Res. 35, 253-263 (1975)) を用いた。すなわち、D M E M 培地 (5% ウシ胎児血清含有) にて培養したラット肝由来筋線維芽細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/100mm dish) に、無血清条件下にて培養したクローン9に、lipofectAMINE (invitrogen) を用いたリポフェクション法によりそれぞれのベクターを導入した。細胞を洗浄後36時間培養し、無血清条件下にて200 pM T G F -  $\beta$  (R&D Systems) と30分培養した。細胞をRIPA バッファー (10 mM Tris-HCl, pH7.8/1% NP40/0.15M NaCl/1 mM EDTA/10  $\mu$ g/ml aprotinin) にてホモジネーションし、得られたライゼートの15000g遠心上清を抗Flag抗体 (sigma)、protein G sepharose (Amersham Bioscience) を用いインキュベーションすることにより免疫沈降反応させた。反応後、沈降物の一部についてS D S ポリアクリルアミド電気泳動を行い、得られたゲルをPVDF膜に



転写後、S m a d 2 及び S m a d 3 のリンカー領域リン酸化特異的抗体並びに C 末端リン酸化特異的抗体を用いてイムノブロットを行った。検出は、H R P 標識した 2 次抗体/抗 I g G、I g H 抗体 (Amersham Bioscience) を用いた化学発光法にて行った。これにより、リンカー領域のリン酸化に対する抗体は、リンカー領域のリン酸化部位を変異させた蛋白質 (E P S M) は認識せず、C 末端のリン酸化に対する抗体は C 末端のリン酸化部位を変異させた蛋白質 (3 S - A) は認識しなかったことより、各抗体の特異性は確認した。

#### 【0067】

なお、3 S - A とは C 末端のリン酸化部位である S e r 2 箇所を A l a に置換したものである。S m a d 3 及び S m a d 2 それぞれのリン酸化される S e r の位置は S m a d 3 では 4 2 3 番目の S e r、4 2 5 番目の S e r であり、S m a d 2 では 4 6 5 番目の S e r、4 6 7 番目の S e r である。

#### 【0068】

また、E P S M はリンカー領域のリン酸化部位である S e r 3 箇所を A l a に置換し、T h r を V a l に置換したものである。S m a d 3 及び S m a d 2 それぞれのリン酸化される S e r 及び T h r の位置は、S m a d 3 では 1 7 8 番目の T h r、2 0 3 番目の S e r、2 0 7 番目の S e r、2 1 2 番目の S e r であり、S m a d 2 では 2 2 0 番目の T h r、2 4 5 番目の S e r、2 5 0 番目の S e r、2 5 5 番目の S e r である。

#### 【0069】

例 2 本抗体を用いた試験系においてリン酸化を阻害する化合物を検出した一例／既知の p38 (リン酸化酵素) 阻害剤を用いた実験例

##### (1) 結果の概要

上記例 1 の実験方法に基づき、化合物を T G F -  $\beta$  で処置する前に既知の p38 阻害剤で処置しておくことにより、S m a d タンパク質のリン酸化を阻害する化合物をスクリーニングできる。本系においてリン酸化酵素である p38 の阻害剤 S B 2 0 3 5 8 0、S B 2 1 0 1 9 0、P D 1 6 9 3 1 6 (いずれも Calbiochem) はリンカー領域のリン酸化を阻害した (図 3)。

#### 【0070】

リンカー領域のリン酸化部位を変異させた c D N A を発現させた細胞では T G F -  $\beta$  依存的な転写活性が抑制されることは既報により報告されている (F.Furukawa, K.Matsuzaki et.al., Hepatology in press)。また、リンカー領域のリン酸化を阻害する p38 阻害剤処置においても T G F -  $\beta$  依存的な転写活性が抑制された (図 4)。

#### 【0071】

これらのことより、S m a d 3 のリンカー領域のリン酸化を阻害することはその活性を抑制することにつながり、本抗体を用いたリン酸化の検出ならびにリン酸化阻害の検出方法は、リン酸化を阻害する化合物の検出のみならず S m a d 3 を阻害する化合物のスクリーニングにもなり得る。

#### 【0072】

##### (2) 方法

ラット肝由来筋線維芽細胞 (M F B,  $2 \times 10^6$  cells/100mm dish) を D M E M (5 % ウシ胎児血清含有) にて数日間培養し、無血清条件下にて 2 0 0 p M T G F -  $\beta$  (R&D Systems) と 30 分培養した。細胞を R I P A バッファー (10 mM Tris-HCl, pH7.8/1% NP40/0.15 M M a C l /1 mM E D T A /10  $\mu$  g/ml aprotinin) にてホモジネーションし、得られたライゼートの 15 000g 遠心上清を S m a d 特異抗体、p r o t e i n G s e p h a r o s e (Amersham Bioscience) を用いインキュベーションすることにより免疫沈降反応させた。反応後、沈降物の一部について S D S ポリアクリルアミド電気泳動を行い、得られたゲルを P V D F 膜に転写後、S m a d 2 及び S m a d 3 のリンカー領域リン酸化特異的抗体並びに C 末端リン酸化特異的抗体を用いてイムノブロットを行った。検出は、H R P 標識した 2 次抗体/抗 I g G、I g H 抗体 (Amersham Bioscience) を用いた化学発光法にて行った。化合物の処置は、T G F -  $\beta$  添加の 30 分前に行い、前記の方法に従い実施した。検出されたバンドは、イメージングアナライザーを用いて定量化した。

## 【0073】

また、TGF- $\beta$  依存的な転写活性は、既報に従い測定した。すなわち、TGF- $\beta$  の標的遺伝子として知られているプラスミノゲンアクチベーターI (PAI-I) のプロモーター領域の pSmad3 結合部位を含む領域の DNA を組み込んだ pGL3 ルシフェラーゼ発現ベクターを用いた。作製したルシフェラーゼ発現ベクターは、RPMI 1640 (5% ウシ胎児血清含有) にて数日間培養した HepG2 細胞の場合、superfect (QIAGEN) を用いたりポフェクション法にて導入し、MFBF1 の場合、lipofectamine (invitrogen) を用いたりポフェクション法にて導入した。その後、化合物を処置し、120分後にTGF- $\beta$  を添加し、24あるいは48時間後細胞を回収しルシフェラーゼ活性を既報に従い測定した。

## 【0074】

例3 抗体を用いたリンカー領域がリン酸化された Smad3 の局在性の検出

## (1) 結果の概要

リンカー領域のリン酸化部位に変異を与えた Smad3 を細胞に発現させ、TGF- $\beta$  刺激で刺激後、リンカー領域のリン酸化を作製した特異抗体で免疫組織化学的な検出を行った。この抗体を用いることにより Smad3 のリンカー領域のリン酸化及びその局在性が確認された (図5A)。また、リンカー領域の変異により Smad3 の核への蓄積が抑制され、さらにp38阻害剤処置においてもその抑制が本抗体を用いることにより観察された (図5B)。

## 【0075】

一方、CC14処置により作製した線維化ラットの肝臓の組織切片を用い、本抗体で免疫組織学的検討を実施した。その結果、リンカー領域がリン酸化された Smad3 は、病態の進行に応じコラーゲン産生細胞の核に特異的に検出された (図6)。このように、本抗体を用いることにより、リンカー領域のリン酸化された Smad3 を病態時の病理切片で確認することが示された。

## 【0076】

よって、本抗体を用いることにより、活性化に重要なリンカー領域のリン酸化された Smad3 の細胞内局在が検出可能となり、病理組織標本を用いた診断も可能となる。

## 【0077】

## (2) 方法

細胞内の検出は既報 (Cancer Res.; K.Matsuzaki et.al. 60, 1394-1402 (2000)) に従って実施した。すなわち、ラット正常肝臓より樹立された肝細胞クローン9 (I.B., Weinstein, et.al. Cancer Res. 35, 253-263 (1975)) を LAB TEK chambers にて培養し、200pM の TGF- $\beta$  と1時間インキュベーションした後、4%パラホルムアルデヒドにより細胞固定化した。それぞれ1次抗体 (Smad2 のC末端及びリンカー領域、並びに Smad3 のC末端及びリンカー領域の各リン酸化特異的抗体) ならびに抗FLAG抗体にて4℃、16時間インキュベーションした。洗浄後Cy2ラベルしたヤギ抗マウスIgG抗体を処置し、蛍光顕微鏡で検出した。

## 【0078】

CC14処置したラット肝臓の凍結断片より4 $\mu$ mの厚さの病理切片を作製し、アセトンにて、4℃、10分間固定させた後、0.3%過酸化水素を含むPBSを室温にて10分間処置した。この固定化切片を用い免疫染色を行った。得られた切片を正常ヤギ血清にて前処置し、1次抗体 (Smad2 のC末端及びリンカー領域、並びに Smad3 のC末端及びリンカー領域の各リン酸化特異的抗体) を4℃、一昼夜インキュベーションし、洗浄後ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG (Vector Laboratories) と更に室温にて40分間インキュベーションした。検出は、ストレプトアビジンHRP reagent (Vector Laboratories) と室温で30分間インキュベーション後、0.02% 3, 3'-デアミノベンジジンテトラヒドロクロリド、0.006% 過酸化水素を含むPBSにて発色させることにより行った。

## 【0079】

例4

## (1) 結果の概要

任意の細胞を TGF- $\beta$  で刺激し、一定時間後に細胞を回収した。そのホモジネートをリン酸化酵素の特異抗体で免疫沈降後、その試料と Smad3 リコンビナントとをインビトロにてインキュベートすることにより Smad3 をリン酸化させ、特異抗体でリン酸化 Smad3 を検出する。本抗体を用いて Smad3 のリンカー領域が p38 及び JNK によりリン酸化されることが確認された。本反応系に候補化合物で処置することにより、リン酸化を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。

## 【0080】

## (2) 方法

培養細胞 (clone 9 という細胞を使用) を 15 時間無血清条件下で培養した後、TGF- $\beta$  を処置し、15 分又は 60 分後に細胞を回収し、リン酸化酵素の活性型であるリン酸化 JNK 又はリン酸化 p38 (これらの酵素は、酵素自身がリン酸化されることにより活性型となる) をそれらの特異抗体 (いずれも Promega 社) で免疫沈降させ、プロテイン G-セファロースを用いて単離し、キナーゼバッファー (25 mM Tris-HCl、pH 7.5、5 mM  $\beta$ -グリセロホスフェート、2 mM DTT、0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_3$ 、10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) で洗浄し、懸濁させたものを酵素標品とした。この酵素標品と、大腸菌で作製したリコンビナント GST-Smad3 及び GST-Smad2 2  $\mu\text{g}$  を 100  $\mu\text{M}$  ATP を含む 50  $\mu\text{l}$  キナーゼバッファーにて反応させた。それを SDS ポリアクリルアミド電気泳動により分離し、作製した各リン酸化抗体を用いたイムノブロット法によりリン酸化 Smad を検出した。その結果を図 7 に示す。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0081】

本発明の抗体及びスクリーニング方法は効率的かつ特異的に Smad リン酸化阻害剤及び抗線維化薬をスクリーニング・取得することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0082】

【図 1】 用いたペプチドの Smad2 及び 3 の 1 次構造上における位置を示す。

【図 2 A】 クローン 9 細胞を用いた Smad2 抗体の特異性を示す。

【図 2 B】 クローン 9 細胞を用いた Smad3 抗体の特異性を示す。

【図 2 C】 MFB 細胞を用いた Smad3 抗体の特異性を示す。

【図 3】 既知の p38 (リン酸化酵素) 阻害剤を用いた実験例を示す。

【図 4】 p38 阻害剤の TGF- $\beta$  依存的転写活性に対する作用 (HepG2 細胞) を示す。

【図 5 A】 Smad3 のリンカー領域のリン酸化およびその局在性を示す。

【図 5 B】 p38 阻害剤処置におけるリン酸化抑制の本抗体を用いることによる観察結果を示す。

【図 6】 組織切片を用いる免疫組織学的検討により、リンカー領域がリン酸化された Smad3 は、病態の進行に応じコラーゲン産生細胞の核に特異的に検出されることを示す。

【図 7】 キナーゼアッセイにおけるイムノブロット法によるリン酸化 Smad の検出を示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> ZERIA Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> PHOSPHORYLATED SITE SPECIFIC ANTIBODY AND SCREENING METHOD USING THE SAME

<130> DA-3546

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 1

Pro	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Pro	Val	Asn	His	Ser
1				5				10						15

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 2

Ala Gly Ser Pro Asn Leu Ser Pro Asn Pro Met Ser Pro Ala  
1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 3

Pro Ser Val Arg Cys Ser Ser Met Ser  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<221> MOD\_RES

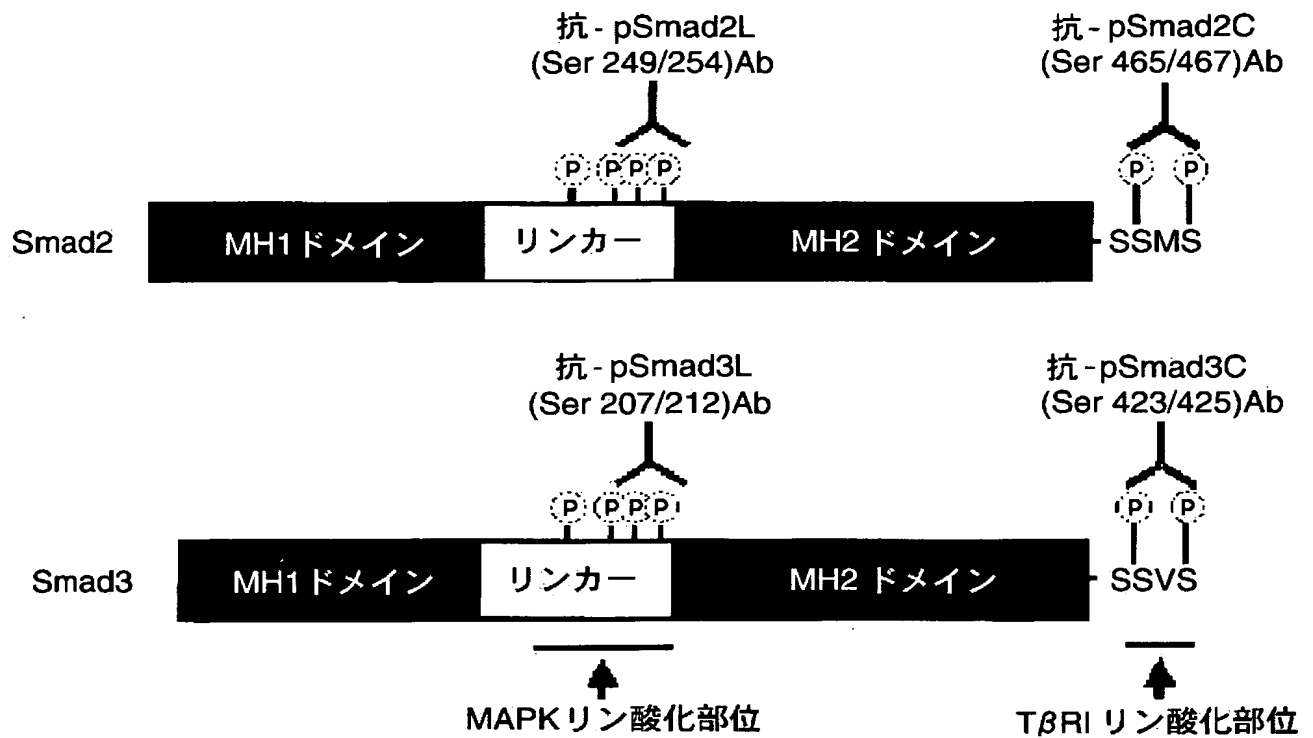
<222> (9)..(9)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 4

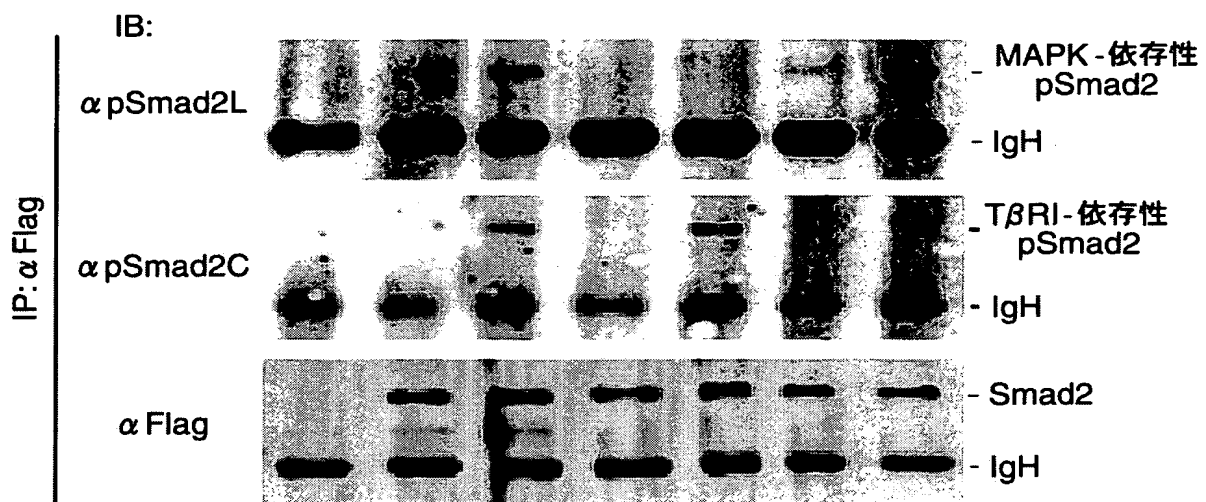
Pro Ser Ile Arg Cys Ser Ser Val Ser  
1 5

【書類名】 図面  
【図 1】

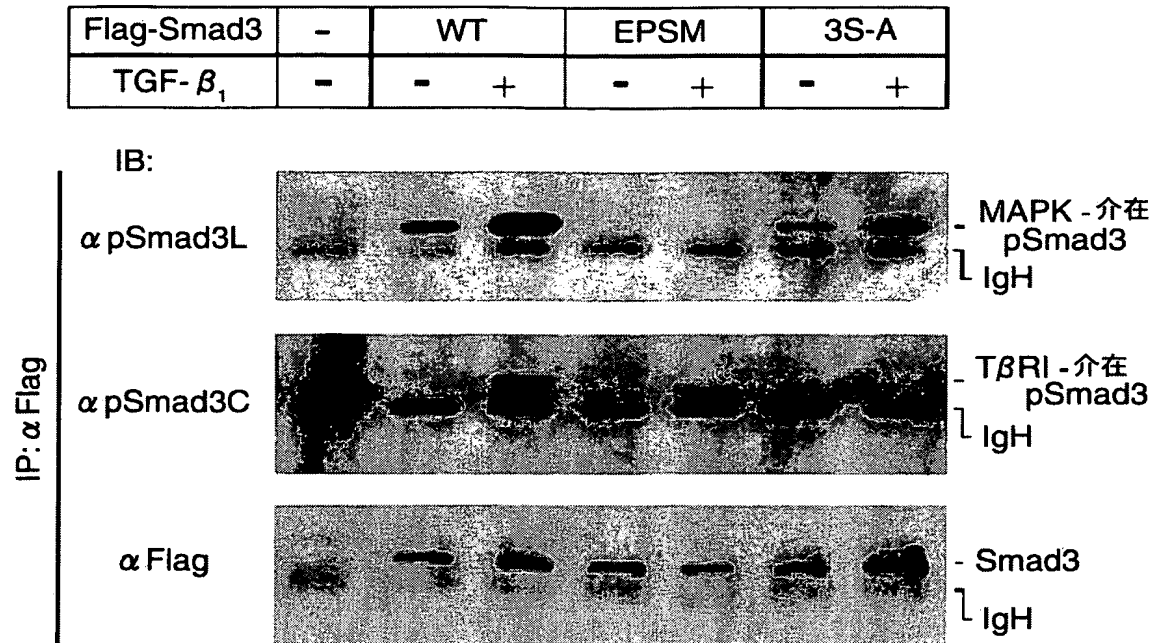


【図 2 A】

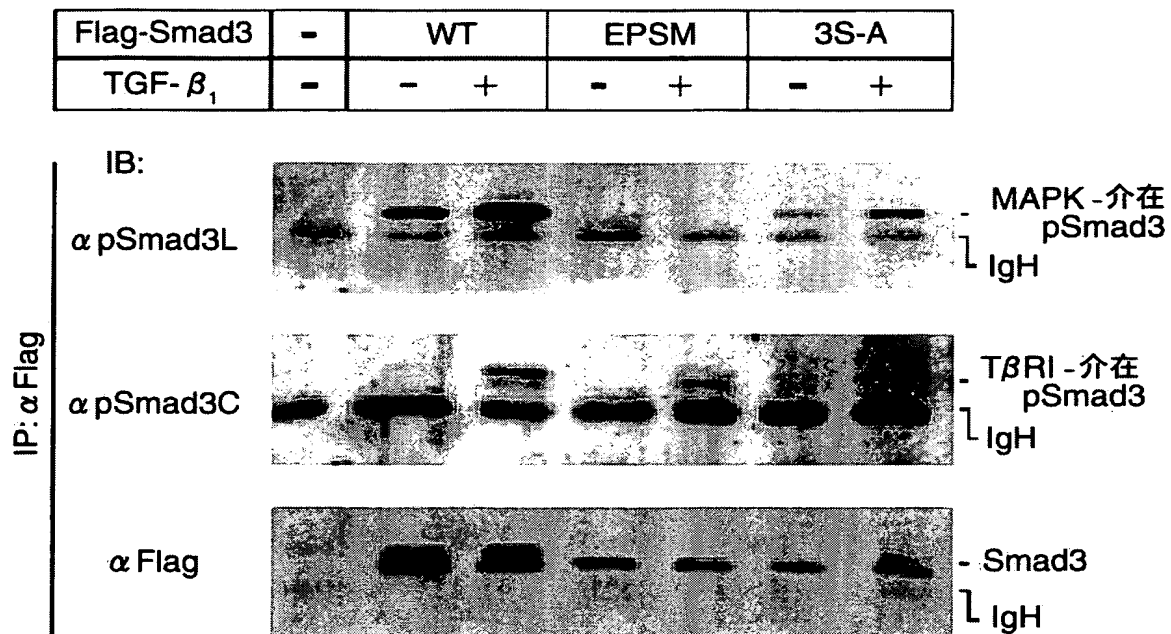
Flag-Smad2	-	WT	EP5M	3S-A
TGF-β <sub>1</sub>	-	- +	- +	- +



【図 2 B】

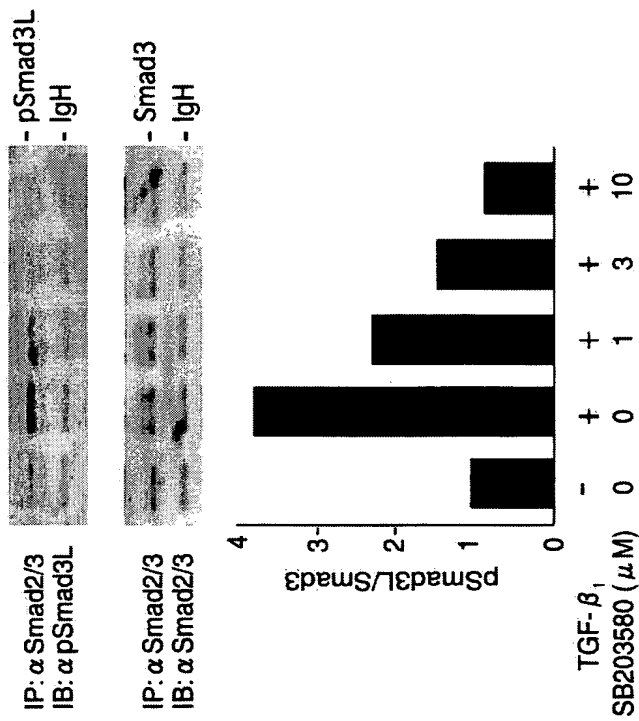
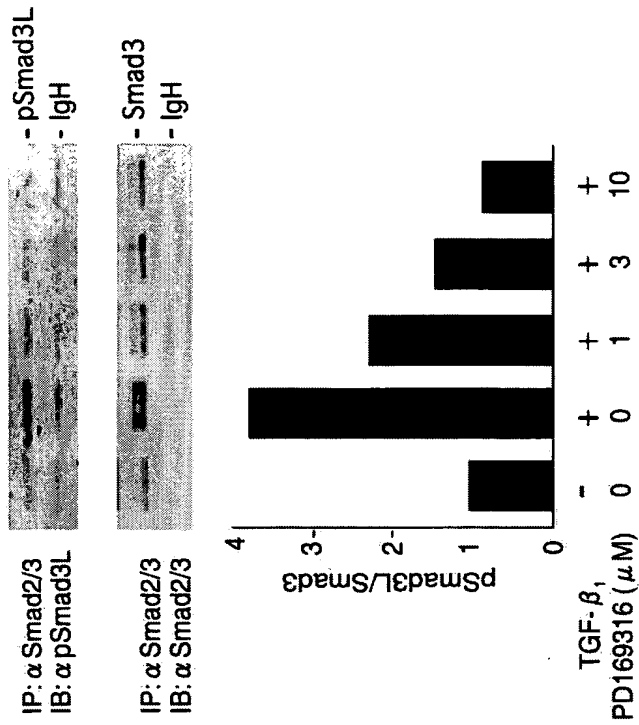


【図 2 C】

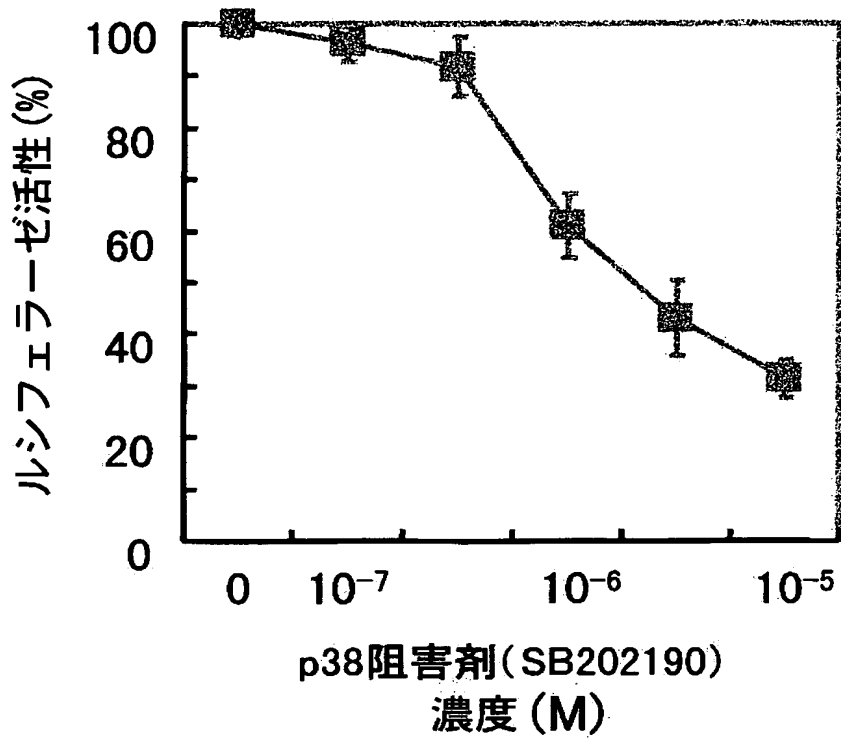




【図 3】



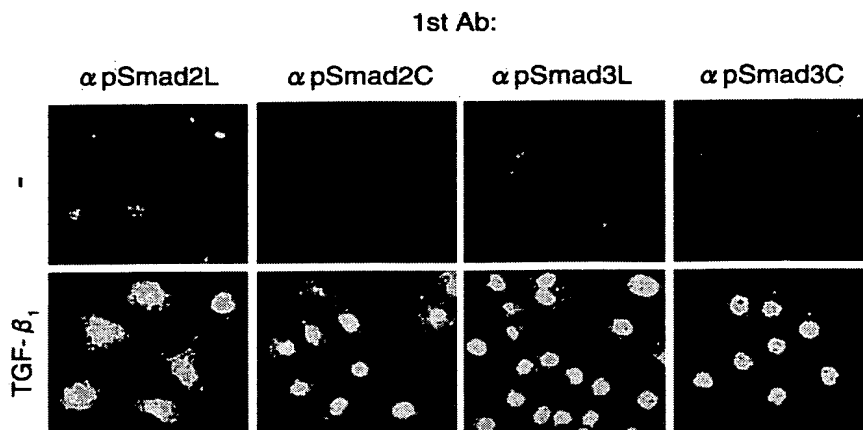
【図 4】



(平均±S.D. n=7)

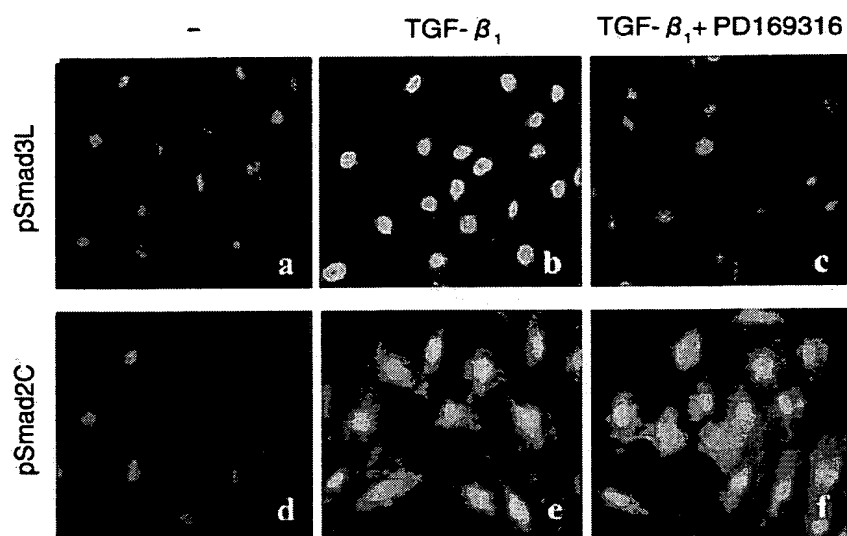
【図 5 A】

## 細胞内局在化の検出



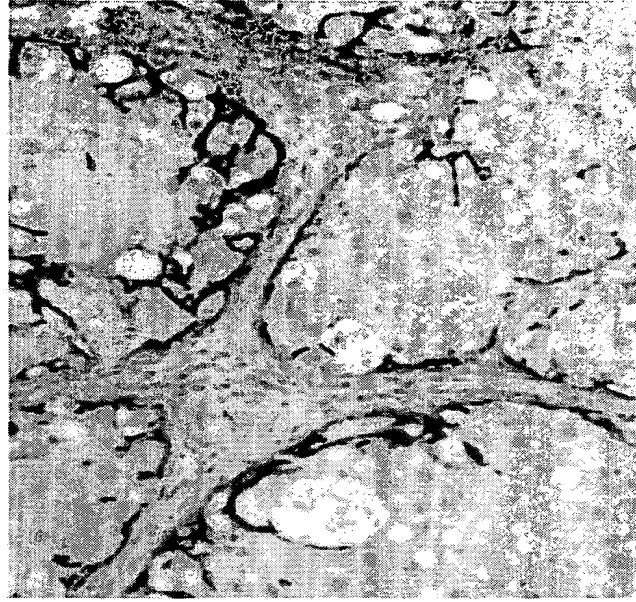
【図 5 B】

阻害剤による影響の検出

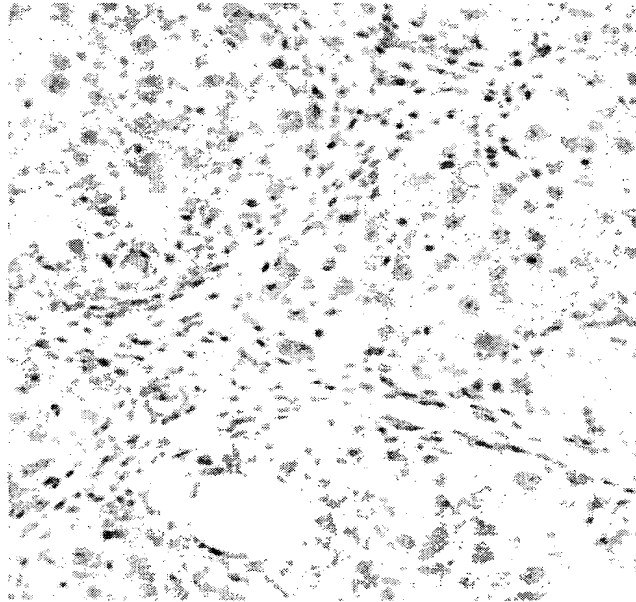


ラット肝線維化モデルの肝臓における  
Smad3リンカー領域リン酸化の免疫組織学的検討

【図 6】



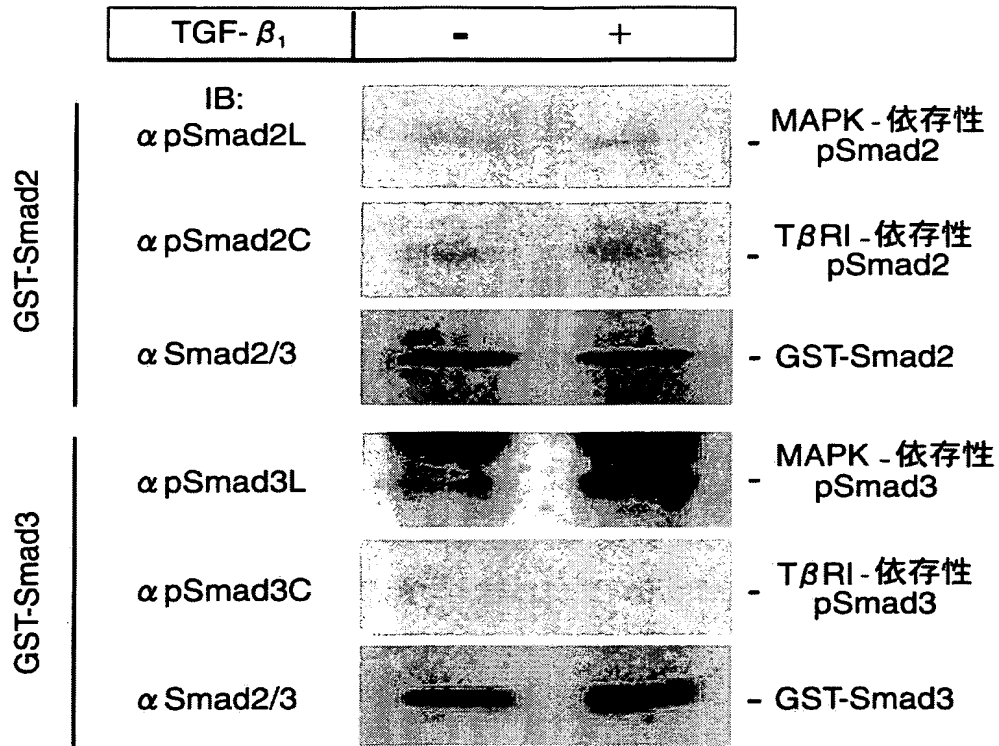
$\alpha$ SMA



pSmad3L

【図 7】

## キナーゼアッセイ

IP:  $\alpha$ pp38

【書類名】要約書

【要約】

【課題】従来のリン酸化検出方法に比べ、より効率良く、より特異的に S m a d リン酸化阻害剤をスクリーニングする。

【解決手段】リン酸化された S m a d 2 のリンカー領域及び S m a d 3 のリンカー領域に特異的なポリクローナル抗体を作製し、これを用いてリンカー領域のリン酸化を阻害することのできる化合物をスクリーニングする。

【選択図】なし

特願 2 0 0 3 - 3 5 1 2 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 0 8 3 3 9 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 9 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋小舟町 1 0 番 1 1 号

氏 名 ゼリア新薬工業株式会社

特願 2 0 0 3 - 3 5 1 2 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 0 4 0 9 2 1 9 ]

1. 変更年月日	2 0 0 0 年 8 月 3 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府守口市文園町 1 0 - 1 5
氏 名	学校法人関西医科大学



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**